

اندازه گیری مقدار پروتئین سرم از روی روش تعیین وزن مخصوص بکمک سرعت نزول قطره سرم

سیدانیم بین وزن و وزن مخصوص رابطه $d = \frac{M}{V}$ برقرار است که در آن d وزن مخصوص،

M وزن و V حجم میباشد. چنانکه ملاحظه میشود تغییر وزن مخصوص ارتباط مستقیم با تغییر وزن دارد. در سرم، این تغییر ارتباط مستقیمی با مقدار پروتئین آن خواهد داشت. اساس تعیین مقدار پروتئین با این روش بر روی رابطه فوق و تعیین وزن مخصوص سرم و سپس تبدیل آن بمقدار پروتئین میباشد، بنابراین اندازه گیری مقدار پروتئین شامل دوزمان است.

۱- اندازه گیری وزن مخصوص.

۲- بدست آوردن مقدار پروتئین از روی وزن مخصوص.

۱- اندازه گیری وزن مخصوص

اساس: در یک لوله استوانه‌ای عمودی از مایعی که قابل آمیزش با آب نمیباشد میریزیم. این لوله دارای دونشانه است که بین این دونشانه زمان نزول قطره سرم را اندازه میگیرند. یک قطره سرم یا پلاسما به حجم ۰.۱ سیلیکتر مکعب را در مایع لوله انداخته و زمان نزول آن را تعیین مینمائیم. این زمان را با زمان نزول یک قطره شاهد که عبارت از محلول سولفات دوپتاسی است که وزن مخصوص آن مشخص میباشد مقایسه نموده و از روی این دوزمان مقدار پروتئین را محاسبه مینمائیم.

وسائل: ۱- لوله میان تهی کاملاً مستقیم که قطر داخلی آن بین ۰/۴ و ۰/۵ سیلیکتر بوده و این قطر در تمام طول لوله ثابت میباشد. جنس لوله از شیشه کاملاً شفاف است که بتوان بخوبی داخل لوله را دید تا اگر قطره وارد لوله نشده و به دیواره چسبیده است معلوم گردد. قطره سرم یا پلاسما یا مایع دیگری که پروتئین آنرا اندازه گیری مینمایند در وسط لوله و بر روی مایع محتوی آن گذارده میشود. ارتفاع لوله بین دو خط نشان ۳ سانتیمتر و در بالا و پائین این دونشانه لااقل ۱ سانتیمتر میباشد تا قطره قبل از رسیدن به خط نشان دارای یک سرعت ثابت گردد. لوله استاندارد که با آن نتیجه بهتری بدست میآید به درازای ۰ سانتیمتر

بوده و سرآن باز میباید تا بتوان بخوبی آنرا شستشو نمود. سوراخ زیرین را میتوان به کمک چوب پنبه ای مسدود و یا از شیر استفاده نمود. لوله شیردار مزیت نسبت به لوله ای که بکمک چوب پنبه مسدود شده است ندارد. زیرا شستشوی لوله بدون شیرآسان تر است.

لوله به یک پایه بسته میشود که بکمک ۳ پیچ که در زیر آن قرار دارد میتوان پایه را کوتاه و بلند نمود.

یک شاقول، عمودی بودن لوله را کنترل مینماید.

۲- پی پت ها که لوله های مؤینه ای هستند که هر یک دارای ۲ نشانه بوده و حجم بین ۲ نشانه ۱ سیلیمتر مکعب و فاصله آن ۴ سانتی متر میباشد خط تحتانی نباید بیش از ۳ سانتی متر بالاتر از پی پت فاصله داشته باشد. انتهای تحتانی بنحوی کشیده شده که کشش سطحی را تا حد اکثر امکان کم میکنند برای راحتی کار بهتر است برای مکیدن ورها کردن مایع مورد آزمایش از میکرو پمپ های پیچ دار استفاده شود بکار بردن سر پستانک کائوچویی کار صحیحی نیست

۳- یک عدد کرومومتر $\frac{1}{10}$ یا $\frac{1}{100}$ ثانیه برای اندازه گیری زمان نزول قطره.

معرفی ها: ۱- محیط برای نزول قطره: بوسیله مخلوط گزین و تراکلور کربن این محیط تهیه میشود. تهیه این محیط بر حسب وزن مخصوص جسم مورد آزمایش متغیر است

Barbour و Hamilton مدتهای مدیدی وزن مخصوص این مخلوطها را مطالعه کرده و تابلوی زیر از نتیجه مطالعات آنها است که بستگی به وزن مخصوص جسم مورد آزمایش دارد.

تراکلور کربن	گزین	مایع مورد آزمایش	وزن مخصوص مخلوط
۱۹-۱۹/۴	۸۱-۸۰/۵	سرم خیلی سبک	۱.۱۵
۲۰-۲۰/۵	۸۰-۷۹/۵	سرم و پلاسما	۱.۰۲-۱.۰۳۲
۲۴-۲۵	۷۶-۷۵	خون کامل	۱.۰۵۵-۱.۰۶۰

۲- محلول اتالون که تهیه آن خیلی دقیق بوده و اساس آزمایش را تشکیل میدهد.

از سولفات دو پتاس انیدر خالص برای تهیه اتالون استفاده میشود مقدار سولفات دو پتاس برای تهیه وزن مخصوص مشخص با درجه حرارت متغیر است تابلوی زیر مقدار لازم سولفات دو پتاس را برای تهیه محلولهایی که وزن مخصوص آنها متفاوت است در حرارت های مختلف نشان میدهد. بوسیله ترازوهای دقیقی که تا $\frac{1}{4}$ میلی گرم دقت دارد سولفات دو پتاس را وزن میکنند و پس از اینکه ۴ ساعت در دسیکاتور خلاء قرار دادند محلول را در آب مقطر جوشان تهیه و پس از خنک شدن تا ۲ درجه حجم آن را در یک فیول ژوژه به ۱۰۰ cc سیرسانند.

وزن مخصوص

سواد مورد آزمایش	۳۵°	۳۰°	۲۵°	۲۰°	۱۵°	گرم در لیتر سولفات دو پتاس . ۲ درصد
پلازما، سرم، ادرار	۱/۰۱۴۷	۱/۰۱۴۸	۱/۰۱۴۹	۱/۰۱۵۰	۱/۰۱۵۱	۱۸/۸۴
غلظت خون کم خونها	۱/۰۲۴۶	۱/۰۲۴۷	۱/۰۲۴۸	۱/۰۲۵۰	۱/۰۲۵۱	۳۱/۷۵
خون کم خون و ترشحات سنگین	۱/۰۳۴۵	۱/۰۳۴۶	۱/۰۳۴۸	۱/۰۳۵۰	۱/۰۳۵۲	۴۴/۵۶
خون طبیعی غلیظ شده	۱/۰۵۴۲	۱/۰۵۴۵	۱/۰۵۴۷	۱/۰۵۵۰	۱/۰۵۵۳	۷۰/۸۱

چنانکه ملاحظه میشود با افزایش درجه حرارت وزن مخصوص نقصان می یابد. نگهداری این محلول ها دقت زیاد لازم دارد بلافاصله پس از تهیه محلول را در شیشه های خنثی ۱۰°C که دارای درب کائوچویی میباشد ریخته و بوسیله کلودیون درب آن را مهر و موم میکنند این اتالون ها را میتوان ۶ ماه در یخچال صفر درجه نگهداری کرد.

۳- محلول اشباع سولفات دومینیزیم .

روش ، لوله را عمودی و دروازه هرنوع جریان هوا در اطراف آن که درجه حرارت آن ثابت باشد روی پایه نصب میکنند انتهای تحتانی لوله را بسته و دوسه سانتی متر محلول سولفات - دومینیزیم اشباع در آن میریزند این محلول برای آن است که قطرات سرم پس از رسیدن به انتهای لوله جذب آن شود .

لوله را از مخلوط ذکر شده در تابلو که وزن مخصوص آن مناسب با سرم یا پلازما یا مایع مورد آزمایش باشد پرمیکنند این وزن مخصوص باید کمی کمتر از وزن مخصوص مایع مورد آزمایش و اتالون ها باشد .

بکمک پی پت و میکروپمپ سرم یا پلازما یا مایع مورد آزمایش را تا خط فوقانی کشیده و سپس انتهای پی پت را که باید وارد محلول شود با کاغذ صافی خشک میکنند نوک پی پت را در سطح محلول داخل لوله کمی فرو برده و بکمک سیکروپمپ مایع داخل پی پت را به مقدار ۱ میلی متر مکعب (از خط فوقانی تا خط تحتانی) وارد مایع میکنند و با یک حرکت سریع

پی‌پت را بالا میکشند بدین ترتیب قطره در داخل محلول رها شده و به طرف پائین در داخل مایع سرازیر میشود.

از چسباندن نوک پی‌پت به جدار لوله باید احتراز شود و باید سعی شود که بکمک دو انگشت دست دیگر پی‌پت کاملاً در وسط مایع قرار گیرد.

زمان عبور قطره را در داخل مایع از دو خط فوقانی و تحتانی لوله توسط کرومومتر یادداشت کرده همین کار را بلافاصله بکمک اتالنی که وزن مخصوص آن در حدود وزن مخصوص مایع مورد آزمایش میباشد هرچه زودتر انجام میدهند و حرارت محیط را نیز بکمک ترموستری که به پایه چسبیده است در نظر میگیرند. باید سعی شود که حرارت محیط در مورد اتالن و مایع مورد آزمایش یکی باشد.

از روی رابطه $d = \frac{d.p}{p \times (1 + \alpha t)}$ بخوبی مشخص میشود که وزن مخصوص با تغییر درجه حرارت تغییر پیدا کرده و هرچه حرارت افزایش می‌یابد از مقدار آن کاسته میشود. از روی این رابطه میتوان وزن مخصوص اتالن را در درجات مختلف بدست آورد.

زمان نزول بین دو خط باید بین ۲ تا ۴ ثانیه باشد و اگر از این حدود خارج شود مخلوط محتوی لوله را بکمک چند قطره از دو مایع محتوی آن آنچنان تغییر میدهیم تا مناسب آزمایش گردد. بهتر است در مواقعی که میخواهیم چند خون مختلف را آزمایش کنیم ۲ یا ۳ لوله از مخلوط به غلظت‌های متفاوت تهیه نماییم اگر چنانچه زمان نزول اتالن و مایع مورد آزمایش خیلی باهم تفاوت دارند باید از اتالنی که بالاتر یا پائین تراز آن حد است و متناسب با مایع مورد آزمایش میباشد مجدداً آزمایش بعمل آید برای جلوگیری از تبخیر مایع داخل لوله که فرار میباشد باید بین آزمایشها انتهای لوله را بوسیله چوب پنبه‌ای مسدود نماییم.

محاسبه: از آباک (Abaque) پیوست که بوسیله بریور (Barbour) و هامیلتون (Hamilton) تهیه شده برای محاسبه استفاده میشود. ابتدا وزن مخصوص نمونه مورد آزمایش (A) بدست می‌آید در مرحله دوم وزن مخصوص اتالن (B) مشخص میگردد.

اختلاف $A - B$ برابر است با اختلاف وزن مخصوص بین نمونه و اتالن. از تفریق عدد A و B عدد مثبت یا منفی بدست می‌آید که برحسب با اضافه یا منهای باید از وزن مخصوص حقیقی استاندارد که در همان شرایط آزمایش قبلاً بدست آمده کم شده و یا افزوده گردد.

مثال - فرض کنیم یک قطره اتالن بوزن مخصوص ۱.۰۲۵ بماند. ۴ ثانیه و در حرارت ۲۰ درجه در لوله محتوی مایع پائین می‌آید و با همین شرایط یک قطره مایع مورد آزمایش ۳ ثانیه نزول میکند.

وزن مخصوص سرم که در مدت ۳ ثانیه نزول کرده از روی آباك برابر با 0.078 می باشد
 وزن مخصوص اتانن که در مدت ۴ ثانیه نزول کرده از روی آباك برابر با 0.052 می باشد
 اختلاف بین A و B $0.026 = 0.078 - 0.052$ است
 وزن مخصوص سرم از روی فرمول $(A-B) +$ وزن مخصوص حقیقی استاندارد بدست
 می آید. و برابر است با $0.276 = 0.026 + 0.25$

وزن مخصوص را بکمک یک نخ و از روی آباك بدین ترتیب بدست می آورند که
 یک طرف نخ را بر روی خط درجه حرارت و درجه حرارت آزمایشگاه که بوسیله ترمومتر مشخص
 گردیده قرار داده و طرف دیگر آن را بر روی زمان نزول بدست آمده و خط مربوط به آن قرار
 می دهند و با امتداد نخ بر روی خط وزن مخصوص، به وزن مخصوص مایع مورد آزمایش پی می برند.

علمی که سبب اشتباه میشود:

۱- اندازه و طرز رها کردن قطره: اندازه قطره باید بدقت تعیین گردد. افزایش حجم
 قطره سبب افزایش زمان سقوط میشود و از روی تجربیات زیادی که بعمل آمده این نتیجه
 بدست آمده است که هرچه حجم قطره و در نتیجه سطح مالش بیشتر باشد سرعت نزول قطره
 کندتر میشود.

۲- درجه حرارت: باید درجه حرارت آزمایشگاه در موقع آزمایش نمونه و اتانن یکی
 باشد زیرا وزن مخصوص مایع مورد آزمایش در درجات مختلف متفاوت است افزایش یک
 درجه سانتیگراد سبب کاهش 0.001×8 وزن مخصوص و اشتباهی معادل 0.01 می گردد.
 ۳- نسبت مخلوط کردن مایع: این نسبت باید بترتیبی باشد که تقریباً وزن مخصوص
 آن با وزن مخصوص مایع مورد آزمایش تطبیق کند. اتانلی که بکار میبریم نیز باید وزن
 مخصوص آن معادل و یا در حدود وزن مخصوص مایع مورد آزمایش باشد.

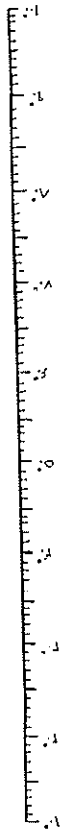
۴- تغییرات کشش سطحی: چنانچه مایع مورد آزمایش حاوی موادی باشد که در
 کشش سطحی آن تأثیر کند از اندازه گیری پروتئین آن بطریق فوق باید خودداری شود مثلاً
 سرمی که حاوی املاح و رنگ دانه های صفراوی است چون کشش سطحی آن بعلت وجود
 املاح صفراوی پائین آمده است مقدار پروتئین آن نباید با این روش اندازه گیری شود.

II - اندازه گیری پروتئین کل سرم و پلاسما از روی وزن مخصوص

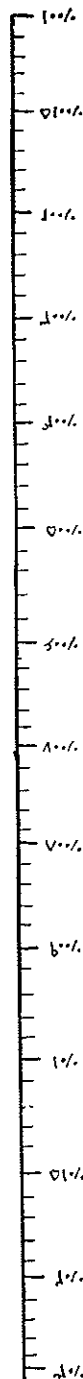
پس از آنکه وزن مخصوص سرم بدست آمد از روی تابلویی که بوسیله آقای دوتراورس
 (de Traverse) و خانم پرترا (Depraitere) پس از سالها تجربه بدست آمده است مقدار پروتئین
 را تعیین مینمایند.



میزان کروی



مدت فرود



وزن نمونه آشکار

(فوق میان قطره و محیط)

بموجب نظریه باربر و هامیلتون

۱۰۲۱	۵۳	۱۰۲۷		۱۰۳۳	۱۰۰
۹	۵۲	۹		۹	۹۹
۸	۵۱	۸		۸	۹۸
۷	۵۰	۷		۷	۹۷
۶		۶		۶	۹۶
۵		۵		۵	۹۵
۴		۴		۴	۹۴
۳		۳		۳	۹۳
۲		۲		۲	۹۲
۱		۱		۱	۹۱
					۹۰
۱۰۲۰	۴۹	۱۰۲۶		۱۰۳۲	۹۵
۹	۴۸	۹		۹	۹۴
۸	۴۷	۸		۸	۹۳
۷	۴۶	۷		۷	۹۲
۶		۶		۶	۹۱
۵		۵		۵	۹۰
۴		۴		۴	۸۹
۳		۳		۳	۸۸
۲		۲		۲	۸۷
۱		۱		۱	۸۶
					۸۵
۱۰۱۹	۴۵	۱۰۲۵		۱۰۳۱	۸۴
۹	۴۴	۹		۹	۸۳
۸	۴۳	۸		۸	۸۲
۷	۴۲	۷		۷	۸۱
۶	۴۱	۶		۶	۸۰
۵		۵		۵	۷۹
۴		۴		۴	۷۸
۳		۳		۳	۷۷
۲		۲		۲	۷۶
۱		۱		۱	
۱۰۱۸	۴۱	۱۰۲۴		۱۰۳۰	۸۸
۹	۴۰	۹		۹	۸۷
۸	۳۹	۸		۸	۸۶
۷	۳۸	۷		۷	۸۵
۶		۶		۶	۸۴
۵		۵		۵	۸۳
۴		۴		۴	۸۲
۳		۳		۳	۸۱
۲		۲		۲	۸۰
۱		۱		۱	۷۹
					۷۸
۱۰۱۷	۳۷	۱۰۲۳		۱۰۲۹	۸۴
۹	۳۶	۹		۹	۸۳
۸	۳۵	۸		۸	۸۲
۷	۳۴	۷		۷	۸۱
۶	۳۳	۶		۶	۸۰
۵	۳۲	۵		۵	۷۹
۴	۳۱	۴		۴	۷۸
۳	۳۰	۳		۳	۷۷
۲		۲		۲	۷۶
۱		۱		۱	
۱۰۱۶	۲۲	۱۰۲۲		۱۰۲۸	۸۰
۹	۲۱	۹		۹	۷۹
۸	۲۰	۸		۸	۷۸
۷		۷		۷	۷۷
۶		۶		۶	۷۶
۵		۵		۵	
۴		۴		۴	
۳		۳		۳	
۲		۲		۲	
۱		۱		۱	
۱۰۱۵		۱۰۲۱		۱۰۲۷	۷۶

جدول دوتراورس و دپتر

برای تعیین مقدار پروتئین از روی وزن مخصوص عده‌ای از مؤلفین از روی محلولهای مختلف الغلظه آلبومین که وزن آلبومین در آنها مشخص است وزن مخصوص هر یک را تعیین کرده و جدولی تدوین نمودند در هر حال تعیین مقدار پروتئین از روی وزن مخصوص تجربی میباشد. ما جدولی را که آقای دوتر اوریس و خانم پرتز تهیه نموده‌اند مینگاریم.

خلاصه : در بین روشهای اندازه گیری پروتئین سرم خون روشهای وزن مخصوص آسانتر و دقیق تر میباشد و در بین آنها نیز روش فوق که وزن مخصوص سرم از روی سرعت نزول قطره تعیین میگردد بعانت اینکه تمام عوامل تغییر وزن مخصوص مخصوصاً حرارت محیط در نظر گرفته میشود دقت بیشتری داشته و بعلاوه بسیار آسان و عملی تر است.

Références

- 1- M. de Travers et M^{mc} depraître. Annales de biologie clinique. No. 10. Octobre 1957.
- 2- Techniques Modernes de laboratoire, 1960
- 3- Extrait d'Annales de biologie clinique. 1958.
- 4- Annales de biologie clinique, No 12. Decembre 1957.